

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIA INSTITUUT

Helen Paapstel

Klooramfenikooli sisaldavate nanofiibermattide efektiivsuse uurimine TDtest meetodil

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad teadur Marta Putrinš, PhD
Liis Preem, MSc

TARTU 2018

Infoleht

Klooramfenikooli sisaldavate nanofiibermattide efektiivsuse uurimine TDtest meetodil

Haavade edukat paranemisprotsessi pidurdavad põletikulised stiimulid ning tihti esinevad infektsioonid. Põletikku ning infektsioonide teket kutsuvad esile ravimitolerantsed persisterrakud, millel esineb antibiootikumi suhtes vastupanuvõime. Persistentsete bakterirakkude esinemist bakteripopulatsioonis uuritakse TDtest meetodi abil. Käesolevas töös viidi läbi katse, et välja selgitada, kas TDtest meetod on efektiivne viis hindamaks klooramfenikooli sisaldavate nanofiibermattide mõju bakterite elumusele ja kasvu inhibeerimisele.

CERCS (B230): Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: nanofiibermatid, klooramfenikool, tolerantsus, TDtest

Testing the efficiency of chloramphenicol loaded nanofiber mats using the TDtest method

Successful wound healing is often slowed down by different inflammatory stimuli and frequently emerging infections. These symptoms are caused by a subpopulation of drug-tolerant persister cells, which are able to overcome the lethal effect of the antibiotic. TDtest method is used to detect these kind of persister cells in the bacterial population. In this thesis, the TDtest was carried out in order to determine the suitability of this method for testing the efficiency of antimicrobial chloramphenicol-loaded nanofiber mats.

CERCS (B230): Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Keywords: nanofiber mats, chloramphenicol, tolerance, TDtest

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
<i>1.1 Antibiootikumid ja nende toimemehhanismid.....</i>	<i>7</i>
1.1.1 Antibiootikumid	7
1.1.2 Rakuseina sünteesi inhibeerimine	8
1.1.3 DNA replikatsiooni inhibeerimine	9
1.1.4 RNA sünteesi inhibeerimine	10
1.1.5 Valgusünteesi inhibeerimine.....	10
1.1.6 Klooramfenikool	11
<i>1.2 Standardsed testid bakterite antibiootikumitundlikkuse mõõtmiseks</i>	<i>11</i>
1.2.1 Vedelsöötme lahjendusmeetod.....	11
1.2.2 Diskdifusioon meetod.....	12
1.2.3 Täiendatud diski meetod.....	13
<i>1.3 Mehhanismid, mis võimaldavad bakteritel antibiootikumide juuresolekul ellu jääda</i>	<i>14</i>
1.3.1 Resistentsus.....	14
1.3.2 Tolerantsus.....	14
1.3.3 Persistentus.....	15
<i>1.4 Nanofiibermatid lokaalseks antibiootikumi raviks.....</i>	<i>16</i>
1.4.1 Klooramfenikooli sisaldavad PCL ja PCL/PEO nanofiibermatid	17
2. Eksperimentaalosa.....	19
<i>2.1 Töö eesmärgid.....</i>	<i>19</i>
<i>2.2 Materjalid ja meetodika</i>	<i>20</i>
2.2.1 Töös kasutatud tüved, söötmed ja kemikaalid	20
2.2.2 Töös kasutatud nanofiibermatid	20
2.2.3 DMSO säilituskultuuri valmistamine	20
2.2.4 TDtest	20
2.2.5 Inhibitsioonitsoonide diameetrite mõõtmine.....	21
<i>2.3 Tulemused.....</i>	<i>22</i>
2.3.1 TDtesti optimeerimine	22
2.3.2 Elektropsinnitud klooramfenikooli mattide efektiivsuse uurimine TDtest meetodil.....	23

2.3.3 Inhibitsioonitsoonide varieerumine CAM/PCL, CAM/PCL/PEO ja filterpaberi tassidel	25
2.4 Arutelu	27
Kokkuvõte	29
Testing the efficiency of chloramphenicol loaded nanofiber mats using the TDtest method.....	30
Kasutatud kirjandus	31
Lihtlitsents.....	36
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	36
Tänu sõnad	37

Kasutatud lühendid

CAM – klooramfenikool

CFU – kolooniaid moodustavate rakkude arv (*Colony Forming Units*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

LB – toitaineterikas sööde (*Lysogeny broth*)

MIC – minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (*Minimal Inhibitory Concentration*)

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*Phosphate buffered saline*)

PBP – penitsilliini siduvad valgud (*Penicillin-binding proteins*)

PCL – polü-ε-kaprolaktoon polümeer

PEO – polüetüleenoksiid polümeer

PTC – ribosoomide peptidüültransferaasne tsenter

TDtest – täiendatud diskdifusiooni meetod (*Tolerance Disk Test*)

Sissejuhatus

Kroonilisi haavandeid iseloomustab kahjustuste pikenenud raviaeg ning kõrgenenud oht infektsioonide tekkele. Haava sattunud erinevate bakterite populatsioonid on võimelised seal moodustama biofilmi ning aktiveerivad seeläbi immuunsüsteemi, mis indutseerib põletiku teket ning paranemisprotsess aeglustub. (Abrigo *et al.*, 2014) Infektsiooniga haavade ravis on tekkinud uued võimalused tänu polümeersete nanofiibermaatriksite tehnoloogia arengule. Elektropsinnitud polümeermaatriksitega on võimalik siduda nii erinevaid antibiootilisi kui ka palju teisi terapeutilisi komponente, mis takistavad haavandis biofilmi teket ning kiirendavad seeläbi kahjustuste efektiivset paranemist.

Persisterrakkude esinemisel populatsioonis on ravi aga märksa keerulisem. Persisteriteks peetakse osapopulatsiooni, millel esineb ravimitolerantsus. See tähendab, et antibiootikum tapab küll suurema osa populatsioonist, kuid osa rakkudest on siiski võimelised ellu jääma ning põhjustavad tingimuste soodustumisel haavas uue infektsioonipuhangu.

Ravimitolerantsuse ja persisterrakkude esinemise kindlaks tegemiseks bakterikultuuris on välja töötatud TDtest meetod. Selle täiendatud diskdifusioon meetodi puhul lisatakse peale esmase inhibitsioonitsooni tekkimist filtrile lisa-toitaineid, mis võimaldab ellu jäänud rakkude taastumist ning kolooniate moodustumist. Kuigi TDtest meetod on töötatud välja selleks, et uurida erinevate bakteriliikide kliiniliste isolaatide omadusi, siis antud töös kasutatakse seda meetodit erinevate omadustega materjalide uurimiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks on anda ülevaade erinevatest antibiootikumi toimemehhanismidest, bakterites esinevatest ellujäämismehhanismidest ning uurida katse läbi TDtest meetodi sobilikkust nanofiibermaatriksite efektiivsuse hindamisel infektsioonide ärahoidmisel ning ravil. Selleks uurisime TDtest meetodil kahe erineva kiirusega antibiootikumi vabastava nanofiibermaatri mõju *E.coli* tüve MG1655 populatsiooni elumusele ning kasvu inhibeerimisele.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Tanel Tensoni juhitud töögrupis.

Märksõnad: nanofiibermaatriksid, klooramfenikool, tolerantsus, TDtest

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Antibiootikumid ja nende toimemehhanismid

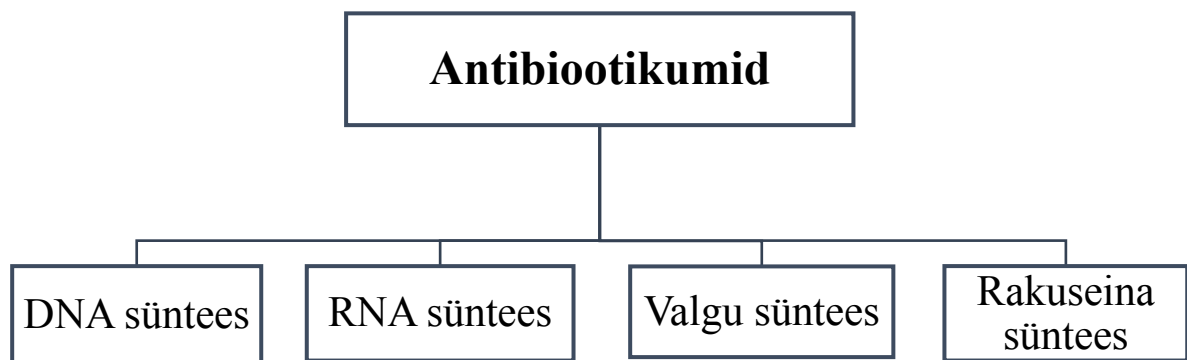
1.1.1 Antibiootikumid

Antibiootikumid on molekulid, mis juba madalatel kontsentratsioonidel inhibeerivad spetsiifiliselt mikroobide kasvu või põhjustavad nende surma. Antibiootikume võib üldjoontes jaotada kaheks – bakteriostaatilisteks ja bakteritsiidseteks. Esimesed häirivad bakterirakkude kasvu, kuid ei põhjusta rakkude surma. Bakteritsiidsed antibiootikumid seevastu tapavad rakud täielikult. (Walsh, 2003)

Alates penitsilliini avastamisest 1929. aastal on välja töötatud väga palju uusi ja veelgi efektiivsemate toimemehhanismidega antimikroobseid ravimeid, mille arengule on tugevalt kaasa aidanud antibiootikumide modifitseerimine ning selgem arusaam antibiootikumi mõjust selle spetsiifilisele sihtmärgile. (Fleming, 1929; Kohanski *et al.*, 2010)

Kõige efektiivsemateks peetakse kolme antibiootikumi – tsiprofloksatsiin, ampitsilliin ja streptomütsiin. Eelmainitud antibiootikumid on oma olemuselt bakteritsiidsed ning mõjuvad bakterirakus mitmele sihtmärgile, vähendades seeläbi resistentsuse teket. Just resistentsuse ilmnemine ning selle laialdane levik viis sünteetiliste antibiootikumide tootmiseni. Viimase 50 aasta jooksul on välja töötatud aga ainult 2 sünteetilist antibiootikumi: fluorokinoloon ja oksasolidinool, millest vaid fluorokinoloon on laia toimespektriga antibiootikum. (Lewis, 2013)

Antibiootikume liigitatakse lisaks sellele, kas ravi tulemuseks on rakusurm või kasvu aeglustumine, ka nende poolt mõjutatavate rakuüsteemide ja -komponentide alusel. Antibiootikumide peamisteks sihtmärkideks bakterirakus on rakuseina, DNA, RNA ja valgu süntees (Joonis 1). (Walsh, 2003)



Joonis 1. Antibiootikumide sihtmärgid bakterirakus

1.1.2 Rakuseina sünteesi inhibeerimine

Peptidoglükaankiht ehk mureiinkiht on bakterirakke kattev maatriks, mis koosneb omavahel glükosiidsidemetega seotud N-atsetüül-muraamhapetest ja N-atsetüülglükoosamiinidest. (Bugg *et al.*, 1992) Peptidoglükaankiht esineb nii gramnegatiivsetel kui ka grampositiivsetel bakteritel. Grampositiivsetel bakteritel on see oluliselt paksem ja mitmekihiline. Kovalentsed peptiidsed ristsidemed annavad kihile vastupidavuse. Peptidoglükaankiht aitab rakul hoida kuju, kaitseb rakku osmootse rõhu eest ning on kinnituskohaks mitmetele rakuvälistele komponentidele, nagu rakupinnal asetsevad valgud ning teihhuuhapped. Bakterirakud on võimelised vastavalt vajadusele peptidoglükaankihi koostist muutma, et keskkonnas toimuvate muutustega efektiivselt toime tulla. (Vollmer *et al.*, 2008)

Grampositiivsetel bakteritel esineb suurem tundlikkus antibiootikumide suhtes, millel puudub täielikult või on ainult väheldane mõju gramnegatiivsetele bakteritele. Erinevus tuleneb viimaste välismembraanis asetsevate poriinide suurusselektiivsusest. Transport läbi membraani saab toimuda vastavalt molekulide suurusele. Grampositiivsetes bakterites aga taoline barjäär puudub, muutes nad mitmete antibiootikumide suhtes vastuvõtlikumaks kui gramnegatiivsed bakterid. Vankomütsiinil, mis inhibeerib bakteri rakuseina sünteesi (Tenover, 2006), on efektiivne antibakteriaalne mõju grampositiivsete bakteritele, kuid ei ole võimeline gramnegatiivsete bakterite välismembraani läbima. Erinevus tuleneb gramnegatiivsete bakterite teistsugusest peptidoglükaankihi ehitusest. (Walsh, 2003)

β -laktaamid ja glükopeptiidid on antibiootikumid, mis mõjutavad bakteriraku rakuseina biosünteesi kindlaid etappe. (Kohanski *et al.*, 2010) β -laktaamid blokeerivad peptidoglükaankihi komponentide ristsidumist liitudes transpeptidatsiooni läbi viiva ensüümi aktiivtsentrisse ning inhibeerides seeläbi peptiidsidemete moodustumist. (Kahne *et al.*, 2005) Glükopeptiidid on aga peptidoglükaani produtseerimise steerilisteks inhibiitoriteks, seondudes peptidoglükaanidega ning vähendades transglükolaasi ja PBP aktiivsust. Rakuseina sünteesi inhibeerivad antibiootikumid põhjustavad muutusi raku kujus ja suuruses ning indutseerivad bakterirakus stressivastuse. (Kohanski *et al.*, 2010)

1.1.3 DNA replikatsiooni inhibeerimine

Kinoloonide peamiseks sihtmärkideks rakus on DNA güraas ehk DNA topoisomeraas II ja topoisomeraas IV. Kinoloonid mõjutavad kromosoomi topoloogiat tekitades replitseerivas DNA-s kaheahelalisi katkeid. (Courcelle *et al.*, 2003) Seondudes topoisomeraas II või topoisomeraas IV-ga, muudavad kinoloonid DNA superspiralisatsiooni. Tekib kinoloon-topoisomeraas-DNA kompleks ning antibiootikum kutsub seejärel esile ensüümi konformatsioonilise muutuse, mille tagajärel teeb topoisomeraas bakteriraku DNA ahelasse katke. Kinoloonid takistavad katkenud DNA ahelate uuesti ligeerumist ja blokeerivad seeläbi replikatsioonikahvli. (Khodursky *et al.*, 1998; Kohanski *et al.*, 2010) Tekkinud katked kutsuvad bakterirakus esile SOS vastuse - RecA aktiveerub ning indutseerib LexA repressorvalgu lagundamise, mis omakorda kutsub esile SOS vastuse geenide avaldumise. (Courcelle *et al.*, 2003)

Kinoloonide surmavat mõju on aga võimalik pärssida RNA sünteesi või valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumidega. (Zhao *et al.*, 1997) On näidatud, et oksoliinhappe bakteritsiidset mõju on võimalik tõkestada valgusünteesi inhibeeriva antibiootikumi klooramfenikooliga. Kinoloonid, nagu oksoliinhape, inhibeerivad DNA replikatsiooni ning toetuvad seejuures suuresti valgusünteesi korrapärasele toimimisele. Klooramfenikool on võimeline näiteks oksoliinhappe põhjustatud superspiralisatsiooni kadu leevendada. (Chen *et al.*, 1996)

1.1.4 RNA sünteesi inhibeerimine

RNA sünteesi inhibeerivate antibiootikumide peamiseks sihtmärgiks rakus on RNA polümeraas (RNAP). RNAP koosneb viiest polüpeptiidist (β , β' , $\alpha 1$, $\alpha 2$ ja ω), millest kaks esimest moodustavad polümeraasi keskmes paikneva lõhe, mille kaudu seondub DNA aktiivtsentrisse. (Artsimovitch *et al.*, 2003) RNA polümeraasi β -alaühikuga seonduvad näiteks rifamütsiinid ning takistavad nii DNA-ensüüm kompleksi moodustumist, põhjustades transkriptsiooni häirumise. (Kohanski *et al.*, 2010)

Mizuno *et al.* (1968) kirjeldas streptovaritsiini mõju *E.coli* transkriptsioonile. Selgus, et streptovaritsiin ei avalda mõju DNA-ensüüm kompleksi moodustumisele, vaid inhibeerib läbi RNA polümeraasi hoopis transkriptsiooni initsiatsioonifaasi. (Mizuno *et al.*, 1968)

1.1.5 Valgusünteesi inhibeerimine

Bakteriaalse valgusünteesi võib jaotada neljaks peamiseks etapiks – initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon ja retsükleerimine. (Wilson, 2014)

Valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide sihtmärgiks rakus on peamiselt elongatsioonifaas. Elongatsiooni mõjutavad ka kõik peamised kliiniliselt kasutusel olevad antibiootikumid nagu klooramfenikool, streptogramiin, tetratsükliin jpt. (Walsh, 2003) Spetsiifiliselt initsiatsioonifaasi mõjutavad antibiootikumid, nagu evernimitsiini ja tiopeptiidid on leidnud kliiniliselt vähe kasutust. Põhjuseks on nende suurem toksilisus ja halb vesilahustuvus. Terminatsiooni- ja retsükleerimisfaasi mõjutavatel antibiootikumidel on lisaks ka arvestatav mõju elongatsioonifaasis. (Wilson, 2014)

Antibiootikumid, mis liituvad 30S alaühikuga initsiatsioonifaasis, inhibeerivad tRNA ja startkoodoni omavahelist kokkupuudet ribosoomi P-saidis. Elongatsioonifaasis 30S alaühikuga seonduvad antibiootikumid inhibeerivad tRNA transporti A-saiti või mõjutavad tRNA liitumisele järgnevat mRNA-tRNA kompleksi translokatsiooni. (Wilson, 2014)

Üheks elongatsioonifaasis 30S alaühikuga liituvaks antibiootikumiks on näiteks tetratsükliin, mis takistab atsüülitud tRNA liitumist A-saiti. (Geigenmüller *et al.*, 1986)

On leitud, et makroliidsed antibiootikumid stimuleerivad peptidüül-tRNA eraldumist ribosoomidest, mis mõjutab rakkude kasvu ja valgusünteesi. (Menninger *et al.*, 1982)

1.1.6 Klooramfenikool

Klooramfenikool on üks esimesi laia toimepektriga antibiootikume, mis eraldati bakterist *Streptomyces venezuelae* 1947. aastal. (Fymat, 2011)

Klooramfenikool seondub ribosoomi 50S alaühiku peptidüültransferaasi tsentrisse takistades transpeptidatsioonil peptiidahela pikenemist ning seeläbi valgu sünteesi bakterirakus. (Howell *et al.*, 2015)

Klooramfenikoolil on bakteriostaatiline mõju. Seetõttu juhul, kui eemaldada antibiootikum bakterikultuurist filtreerimise või tsentrifuugimise teel, ribosoomide töövõime taastub. (Fymat, 2011)

Klooramfenikool on efektiivne ravim anaeroobsete bakterite vastu, toimib nii mitmete grampositiivsete ja gramnegatiivsete bakterite kui ka klamüüdiade, mükoplasmade ja riketsiate poolt põhjustatud infektsioonide korral. (Howell *et al.*, 2015)

1.2 Standardised testid bakterite antibiootikumitundlikkuse mõõtmiseks

1.2.1 Vedelsöötme lahjendusmeetod

Lahjendusmetoodikad on standardised *in vitro* antibiootikumitundlikkuse määramise meetodid ning neid kasutatakse ka teiste testmeetodite efektiivsuse testimisel. (Wiegand *et al.*, 2008)

Vedelsöötme lahjendusmeetod (ing k., broth dilution method) jaotub kaheks – makrolahjendus- ja mikrolahjendusmeetodiks. Meetodite erinevus seisneb inokulumi mahus. Makrolahjenduse puhul on mahuks ≥ 1 ml (tavaliselt 2 ml) ning mikrolahjenduse puhul 0,1 ml. Mikrotiiterplaatide kasutuselevõtt on aidanud kaasa mikrolahjendusmeetodi laialdasele levikule ning testi peetakse rahvusvaheliselt standardseks antibiootikumitundlikkuse testmeetodiks. (Howell *et al.*, 2015)

Lahjendusmeetodil tekib antibiootikumi kahekordsete lahjenduste rida vedelsöötmes. Inokuleerides võrdsel kogusel rakke erineva antibiootikumi kontsentratsiooniga söötmetesse on võimalik näha, millise antibiootikumi kontsentratsiooni juures on bakterid võimelised kasvama.

Et hinnata bakteritüve vastust mingile kindlale antibiootikumile, kasutatakse minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni ehk MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) parameetrit. MIC-i defineeritakse kui madalaimat antibiootikumi kontsentratsiooni, mille juures on

mikroorganismi nähtav kasv pärsitud. Parameetri abil on võimalik määrata, kas bakteritüvi on spetsiifilise antibiootikumi suhtes tundlik, vahepealne või resistentne. (Kahlmeter *et al.*, 2003) MIC parameetri abil on võimalik jälgida ka bakterikultuuris antibiootikumiresistentsuse teket. Muteerunud tüvedel, mis on saavutanud resistentsuse, on MIC väärtus kõrgem kui metsiktüve populatsiooni kõrgeim MIC väärtus ehk metsiktüve piirväärtus (wild-type cut-off value). See aitab eristada resistentsuse omandanud tüvesid metsiktüvest. (Kahlmeter *et al.*, 2003)

Kõigi testide puhul on vajalik nende standardiseerimine, sest tulemused võivad varieeruda vastavalt läbiviimistingimustele. Mitmed organisatsioonid nagu CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) ja EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) on välja andnud detailsed juhendid, mida järgides on võimalik laboris teste läbi viia. (Wiegand *et al.*, 2008)

Täpsete tulemuste saamiseks on oluline testis kasutatavate bakterirakkude arvukuse standardiseerimine. Soovitavaks inokulumi mahuks on 5×10^5 CFU ml⁻¹. (Wiegand *et al.*, 2008) Kõrgema CFU kontsentratsiooni korral võib esineda MIC väärtuse suurenemine. Seda juhul, kui uuritav bakterikultuur on võimeline keskkonnast ensümaatilisel antibiootikumi lagundama. Võib esineda nn. inokulumi efekt, mis põhjustab 8-kordse või suurema MIC väärtuse tõusu. Efekt esineb tihti β -laktaamide tundlikkuse testimisel bakterikultuuris, kus rakud on võimelised produtseerima β -laktamaase ning seeläbi vähendama antibiootikumi kontsentratsiooni ja letaalsel mõju. (Wiegand *et al.*, 2008)

1.2.2 Diskdifusioon meetod

Diskdifusiooni test, tuntud ka kui Kirby-Baueri meetod, on laialdast kasutust leidnud alternatiiv vedelsöötme lahjendusmeetodile. (Bauer *et al.*, 1966)

Meetod hõlmab endas uuritava bakterikultuuri külvamist tassile, tagades seejuures, et kasv tassil oleks jaotunud ühtlaselt üle kogu agari pinna. Külvamiseks kasutatakse tavaliselt steriilset vatitikku, mis kastetakse rakukultuuri ning seejärel kantakse rakud tikuga ühtlaselt agari pinnale. (Matuschek *et al.*, 2014)

Antibiootikumi sisaldav filter asetatakse agarile 15 minuti jooksul pärast inokulatsiooni. Tassile saab asetada ka mitu filtrit, kuid kõik tekkivad tsoonid peavad pärast inkubatsiooni olema selgelt eristuvad. Tasside inkubatsiooniaeg ei tohiks ületada 16-20h, sest pikema aja jooksul

võivad inhibitsioonitsoonides tekkida juba kolooniad. Samuti muutuvad tsoonide piirjooned hajusaks ning ebatäpseks. (Matuschek *et al.*, 2014)

Inhibitsioonitsoonide suurust võivad mõjutada mitmed faktorid. Rolli mängivad nii tardsöötmete valmistusviis, inkubatsiooni temperatuur ja kestus kui ka pärast inkubatsiooni tsooni diameetri mõõtmistäpsus. (Matuschek *et al.*, 2014)

Vedelsöötme lahjendusmeetod on võrreldes diskdifusiooni meetodiga efektiivsem viis anaeroobsete bakterite antibiootikumitundlikkuse testimiseks, sest vedelsöötmes on võimalik vältida anaeroobsete bakterite kokkupuudet letaalse koguse hapnikuga. (Stalons *et al.*, 1975)

1.2.3 Täiendatud diski meetod

Diskdifusioonimeetod ei erista aga tolerantseid baktereid tundlikke, sest samaaegselt antibiootikumi kontsentratsiooni langusega söötmel, hakkavad agaris otsa saama ka kasvuks vajalikud toitained, mille kasutavad ära väljaspool tsooni kasvavad rakud. Täiendavaid toitaineid sisaldav filter asendatakse agaril oleva antibiootikumifiltriga 18h pärast antibiootikumi lisamist. Alternatiivselt võib toitalahuse lisada otse antibiootikumifiltrile tilgutades. Gefen *et al.* 2017 kasutas täiendavaks toitaineiks glükoosi, kuid võimalik on ka teiste toitaalainete lisamine. Täiendatud diskdifusiooni meetodil ehk TDtest meetodil lisatav toiduallikas ennetab tsoonisisese toitaalainete defitsiidi teket. Tsoonis ellu jäänud bakterite elumus taastub pärast antibiootikumifiltri asendamist toiduallikat sisaldava filtriga ning rakud on võimelised moodustama silmnähtavaid kolooniaid. (Gefen *et al.*, 2017) Toiduallika lisamisel jälgitakse tassil toimuvaid muutusi. Esimesed kolooniad võivad ilmned juba paari tunni jooksul. (Gefen *et al.*, 2017)

Lisaks tolerantsetele bakteritele võimaldab TDtest meetod kindlaks teha ka persisterite olemasolu. Testis ilmneb kahefaasiline rakkude suremise kõver aias, mis on iseloomulik persistentsusele – osapopulatsioon kultuurist on võimeline toitaalainete olemasolul pikemaajaliselt antibiootikumi letaalsele mõjule vastupanu osutama. (Gefen *et al.*, 2017)

1.3 Mehhanismid, mis võimaldavad bakteritel antibiootikumide juuresolekul ellu jääda

1.3.1 Resistentsus

Antibiootikumi bakteritsiidsest toimest pääsemiseks on bakteritel kasutusel mitmeid mehhanisme. Bakterid võivad vähendada näiteks membraani läbilaskvust või suurendada toksiliste ainete rakust väljapumpamist. Samuti on bakterid võimelised läbi viima muutusi ravimi sihtmärgis, kasutades selleks mutatsioone ja/või ensümaatilisi modifikatsioone. Lisaks võivad rakud ravimi ensümaatilisel kahjutuks muuta. (Depardieu *et al.*, 2007)

Kuna antibiootikumid võitlevad vaid organismi sattunud võõraste rakkudega, olles suhteliselt ohutud organismi enda kudedele, omavad nad kõrvalmõjusid enamasti vaid suurte dooside manustamisel. Seetõttu on nende ravimite väljakirjutamine olnud senini leebe kontrolli all. Paljudele patsientidele kirjutatakse antibiootikumiravi välja juba infektsiooni ilmingul ilma täpsema diagnoosita. See on üsna kiiresti viinud patogeensete bakterite laialdase antibiootikumiresistentsuse tekkeni. (Fymat, 2011)

Resistentsuse teket hõlbustavad bakterirakkude kõrge arvukus populatsioonis ja neile omane lühike generatsiooniaeg. Kui mutatsioon tekib geenis, mis mõjutab keskkonnas oleva antibiootikumiga toimetulekut, jäävad muteerunud rakud ellu. (Walsh, 2003)

Bakterirakkude muteerumine võib toimuda antibiootikumiravi jooksul väga kiiresti ning on seetõttu ülimalt tõenäoline. Seepärast võib järeldada, et mida laialdasemalt on antibiootikum kasutusel, seda tõenäolisem on vastavale antibiootikumile resistentsuse teke. Seda juhul, kui tekkeks pole vajalik mitme mutatsiooni esinemine genoomis. (Walsh, 2003)

1.3.2 Tolerantsus

Tolerantsuseks nimetatakse bakterite suurenenud vastupanuvõimet antibiootikumi suhtes, samas kui MIC väärtus ei muutu. Tolerantsusele võivad kaasa aidata nii geneetilised kui ka füsioloogilised faktorid. (Tuomanen *et al.*, 1985)

Tolerantsuse võib jaotada kaheks – aeglase kasvu tolerantsus ja lag-faasi tolerantsus. Aeglane kasv võib rakule edasi kanduda geneetiliselt raku eellastelt, kellel esineb pärilik aeglustunud kasv. Füsioloogiliselt võib aga aeglane kasv tuleneda ka ebasoodsatest kasvutingimustest, raku

asukohast biofilmis või kokkupuutest kasvuinhibiitoritega. Aeglustunud kasvu esilekutsuvas keskkonnas on rakkude tapmisefektiivsus madalam. (Brauner *et al.*, 2016)

Aeglase kasvu tolerantsuse erijuhtumiks on ravimi poolt esilekutsutud tolerantsus, mille puhul reageerib bakterirakk keskkonnas olevale antibiootikumile ning reguleerib vastavalt sellele enda kasvu. Sellist mehhanismi esineb nii gramnegatiivsetel kui ka grampositiivsetel bakteritel. (Brauner *et al.*, 2016)

Kasvutingimuste muutus (nälginud rakud külvatakse ümber uude toitaineterikkasse söötmesse) kutsub bakterirakus esile lag-faasi, mille puhul on rakkude kasv aeglustunud seni, kuni bakterikultuur on võimeline end ümber lülituma uutes tingimustes hakkama saamiseks. Lag-faas tolerantsus esineb kultuuris siis, kui antibiootikumi toimeaeg on lühem kui kasvu peatumine, ning võimaldab tolerantsust indutseerida mitmetele antibiootikumidele. (Brauner *et al.*, 2016)

1.3.3 Persistentsus

Persistereid võib kirjeldada kui isogeenses bakterikultuuris tekkinud osapopulatsiooni, millel esineb keskkonnas oleva antibiootikumi suhtes tolerantsus. (Kaldalu *et al.*, 2016) Persistentsus ja tolerantsus erinevadki teineteisest vaid seetõttu, et tolerantsus esineb kogu populatsioonis, samal ajal kui persistentsus esineb osapopulatsiooni. Persistentsuse esinemist kirjeldab kahefaasiline rakkude suuremise kõver ajas, mis kaldub kõrvale bakteripopulatsiooni eeldatavast kõverast. Keskkonnas võivad esineda sel juhul kaks erineva fenotüübiga alampopulatsiooni – antibiootikumi suhtes tundlik ja persistentne alampopulatsioon. Persistented rakud hõlmavad väga väikese osa, tavaliselt vaid alla 1% populatsioonist ning nende suremus on võrreldes tundlike rakkudega tunduvalt väiksem. (Brauner *et al.*, 2016)

Persistentsus nagu tolerantsuski ei ole geneetiliselt päritav omadus. Keren *et al.* (2004) viisid läbi katse, kus eksponentsiaalse kasvufaasini kasvatatud *E. coli* tüve K12 rakkudele lisati ampitsilliini. Kolme tunni jooksul viis doos kultuuri tugeva lüüsin. Katses ilmnas kahefaasiline tapmine, kus esines kultuuris nii kiiresti lüüsuvaid rakke kui ka fraktsioon persistereid. Pärast 3-tunnist inkubeerimist pesti ja inokuleeriti allesjäänud rakud uues söötmes ning seejärel kasvatati üleöö. Persisterrakkudest kasvanud populatsiooni testiti taas ampitsilliiniga. Ilmnas

originaalkultuuriga sarnane muster, kus enamus rakke suri, kuid väike osa kultuurist jäi ellu, mis näitab, et persistentsus ei kandu edasi pärilikult. (Keren *et al.*, 2004)

Persistentsust võib sarnaselt tolerantsusele jaotada kaheks – ajast sõltuv persistentsus ja doosist sõltuv persistentsus. Vormid on teineteisest dünaamiliselt väga erinevad. Ajast sõltuva persistentsuse korral esineb osapopulatsioonil pikem lag-faas või aeglasem kasv. Doosist sõltuva persistentsuse korral on rakud võmelised lühiajaliselt aktiveerima toksiliste ainete rakust väljapumpamist või multiresistentsust tagava (marRAB) operoni, mis leevendab antibiootikumiga toimetulekut, ilma et toimuks muutusi rakkude kasvukiiruses. (Brauner *et al.*, 2016)

1.4 Nanofiibermatid lokaalseks antibiootikumi raviks

Tänu nanotehnoloogia arengule on potentsiaalselt tulevikus võimalik toota biomimeetiliste omadustega nanofiiberstruktuure, mis aitaksid kaasa lokaalsete infektsioonide efektiivsemale ravile. (Greiner *et al.*, 2007).

Nanofiibreid valmistamiseks elektrospinnimismeetodil. Elektrospinnimisel kasutatakse ära kahe elektroodi vahele tekkivat elektrivälja. Elektrivälja abil voolutatakse elektroodide vahele asetatud nõelast sulatatud polümeeri või polümeerilahust elektriväljas asuvale kollektorile, mille tulemusel tekib kollektori pinnale polümeerkiududest maatriks. (Bhardwaj *et al.*, 2010)

Nanofiibrite struktuuri on võimalik lisada ka mitmeid terapeutilisi komponente. Kõige enam levinud on antibiootikumid ning mitmed teised antibakteriaalsed ained. (Hu *et al.*, 2014) Lisades nanofiibermaatriksisse antibiootikumi või mõnda muud ravimit, on võimalik luua fiibervõrk, mis mimikeerib inimkeha füsioloogilisi tingimusi ning on võimeline samaaegselt vabastama terapeutiliste ning põletikuvastaste omadustega bioaktiivseid aineid. (Chen *et al.*, 2015)

Nanofiibermatte on tulevikus potentsiaalselt võimalik kasutada näiteks bakteriaalsete biofilmide ning implantaatidega kaasnevate infektsioonide raviks ning fiibritest on võimalik valmistada haavasidemeid ning -plaastreid. (Chen *et al.*, 2015)

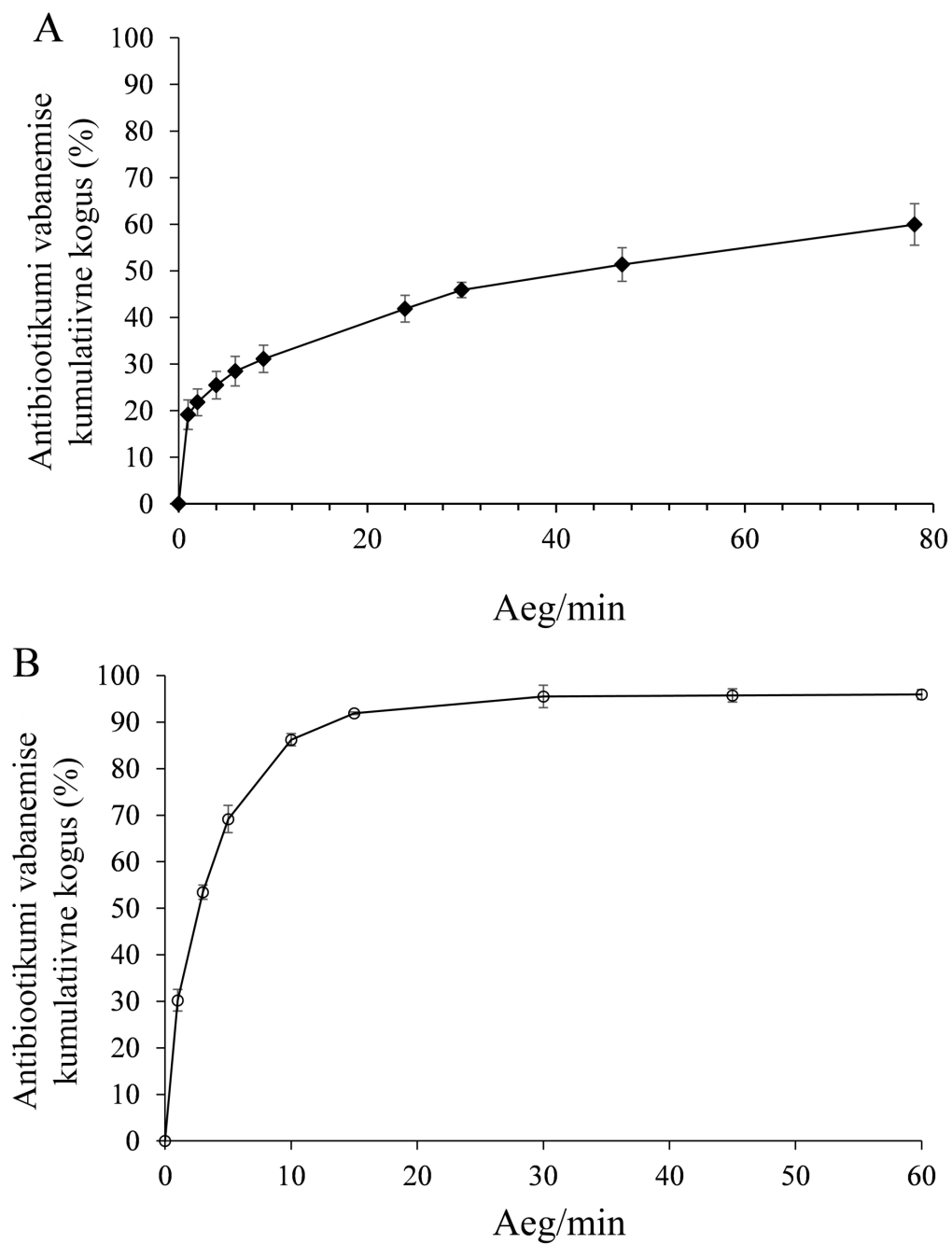
Nanofiibermattide valmistamiseks kasutatakse mitmeid looduslikke ja sünteetilisi polümeere, mille valikul on võimalik kontrollida nanofiibermattide hüdrofiilsust/hüdrofoobsust ja degradatsioonilisi. Need omadused mõjutavad omakorda nanofiibritest raviainete vabanemiskineetikat. (Hu *et al.*, 2014)

1.4.1 Klooramfenikooli sisaldavad PCL ja PCL/PEO nanofiibermatid

Preem *et al.* (2017) valmistasid klooramfenikooli sisaldavaid elektrosprotsinitud nanofiibermatte, kasutades erinevaid polümeere. PCL ehk polü-ε-kaprolaktoon on poolkristalliline hüdrofoobne biolagunev polümeer. (Wang *et al.*, 2017) PCL mitmekülgsus teeb sellest ideaalse materjali ravimikandjate konstrueerimisel. Polümeerile on võimalik lisada mitmeid funktsionaalrühmasid, mis mõjutavad maatriksi hüdrofiilsust, kinnitusvõimet ning biosobivust. Seeläbi on võimalik efektiivselt kontrollida PCL nanofiibritest valmistatud maatriksitest raviaine vabanemist keskkonda. (Woodruff *et al.*, 2010) PEO ehk polüetüleenoksiid on vees lahustuv, mitteiooniline ning tugevalt hüdrofiilne polümeer, mis on leidnud laialdast kasutust. (Dhawan *et al.*, 2005)

Preem *et al.* (2017) viisid läbi rida katseid kirjeldamaks klooramfenikooli sisaldavaid PCL ja PCL/PEO polümeeridest elektrosprotsinitud nanofiibermatte, mis oleksid tõhusateks vahenditeks infektsioonide ärahoidmiseks ning raviks. Katsetes selgus, et antibiootikum eraldub PCL maatriksist aeglasemalt – 78 tunni jooksul oli eraldunud vaid 60% kogu raviainest (Joonis 2.). Aeglasem vabanemine maatriksist on tingitud PCL nanofiibrite hüdrofoobsusest. Samuti on hüdrofoobne ka CAM (klooramfenikool) molekul, mis loob PCL-ga seetõttu tugevamaid sidemeid. Lisades mattidele PEO polümeeri, kiirenes antibiootikumi vabanemine tunduvalt – esimese 15 minuti jooksul vabanes mattidest 92% ning pärast esimest tundi juba 95% kogu raviainest (Joonis 2). (Preem *et al.*, 2017)

Mattide antibakteriaalset mõju hinnati diskdifusiooni meetodil, milles aga ei ilmnunud oodatavaid erinevusi PCL ja PCL/PEO mattide inhibitsioonitsoonides. Seetõttu polnud võimalik selle testiga hinnata antibiootikumi vabanemise kiiruse mõju bakteritele. (Preem *et al.*, 2017)



Joonis 2. Antibiootikumi eraldumine CAM/PCL (A) ja CAM/PCL/PEO fiibermattidest (B) PBS puhvril 37°C kraadi juures. Kohandatud Preem et al. (2017)

PCL - polü-ε-kaprolaktoon polümeer; PEO – polüetüleenoksiid polümeer;

CAM – klooramfenikool; PBS - fosfaadiga puhverdatud soolalahus; min – minut.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

1. Selgitada välja, kas DTtest sobib antibiootikumi sisaldavate nanofiibermattide uurimiseks.
2. Uurida TDtesti abil erineva kiirusega klooramfenikooli eraldavate PCL ja PCL/PEO nanofiibermattide võimet inhibeerida bakterite kasvu pikema ajal vältel.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud tüved, söötmed ja kemikaalid

Käesolevas töös kasutati *Escherichia coli* MG1655 bakteritüve. *E. coli* MG1655 DMSO säilituskultuurist tehti 10x lahjendus filtreeritud LB-Lennox Difco™ vedelsöötmesse ning rakke kasvatati 37°C kraadi juures loksutil *Sanyo orbital incubator* 24h statsionaarse kasvufaasini. Testide läbiviimiseks külvati rakud LB-Lennox Difco™ tardsöötmele.

Katsetes kasutati 20% ja 32% filtreeritud glükoosilahust. Katsetes kasutatud antibiootikumilahuste alglahuseks oli 50 mg/mL etanoolis lahustatud klooramfenikoolilahus, millest tehti lahjendused destilleeritud vette.

2.2.2 Töös kasutatud nanofiibermatid

Nanofiibermatid olid valmistatud Liis Preemi poolt Farmaatsia Instituudis. TDtesti läbiviimiseks lõigati CAM/PCL ja CAM/PCL/PEO nanofiibermaterjalidest välja 6mm läbimõõduga kettad. Selleks asetati matid kahe fooliumlehe vahele ning ketaste väljalõikamiseks kasutati augurauda.

2.2.3 DMSO säilituskultuuri valmistamine

DMSO säilituskultuuri valmistamiseks kasvatati tardsöötmetelt kogutud koloonia rakke 3h filtreeritud LB vedelsöötmes kuni optilise tihduseni 0,6 lainepikkusel 600 nm. Rakukultuurile lisati DMSO-d 8% lõppsisalduseni ning seejärel jagati tuubidesse mahus 120µl. DMSO kultuuri säilitati -80 kraadi juures.

2.2.4 TDtest

Katse viidi läbi Gefen et al. (2017) poolt välja pakutud TDtest meetodil, mis hõlmas endas DMSO säilituskultuurist 100x lahjenduse tegemist LB vedelsöötmesse, milles kasvatati rakke üleöö statsionaarse kasvufaasini.

Rakukultuuri lahjendusest (kontsentratsiooniga 10^6 CFU/ml) plaaditi vatitikuga 100µl LB tardsöötmetassile. Igale tassile lisati 6mm dimeetriga paberfilter või elektrospinnitud

fiibermatt. Filtritele tilgutati 5µl vastava kontsentratsiooniga CAM lahuseid Tasse inkubeeriti 18h 37°C kraadi juures.

Plaadile tekkinud tsoonid skaneeriti ning seejärel tilgutati pooltele plaatidel olevatele filtritele 5µl 32% glükoosilahust ning pooltele 5µl destilleeritud vett, et selgitada välja, kas inkubeerimisjärgne kolooniate teke on tingitud lisatud toiduallikast või esineb kolooniate tekkimine ka ilma C-allika lisamiseta. Tasse inkubeeriti üleöö.

Järgmisel päeval tassid skaneeriti taas ning korrati eelmist etappi lisades pooltele tassidest 5µl 32% glükoosilahust ning pooltele sama kogus destilleeritud vett. Plaadid inkubeeriti üleöö 37°C kraadi juures. Järgmisel päeval tassid skaneeriti.

2.2.5 Inhibitsioonitsoonide diameetrite mõõtmine

Inhibitsioonitsoonide diameetrite mõõtmiseks kasutati testi läbiviimisel tehtud skaneeringuid. Diameetrite mõõtmiseks kasutati programmi *ImageJ*. Mõõtmisel võeti teadaolevaks pikkuseks tassi diameeter, milleks oli 88mm. Seejärel mõõdeti igal tassil esinev inhibitsioonitsooni diameeter eraldi.

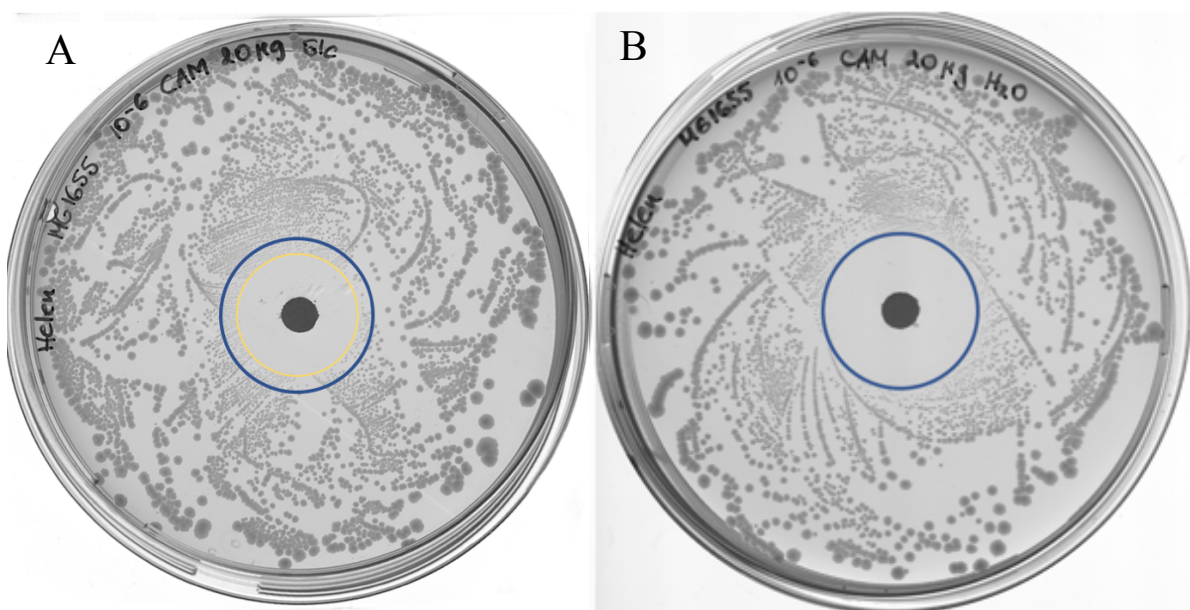
2.3 Tulemused

2.3.1 TDtesti optimeerimine

Selleks, et uurida PCL ja PCL/PEO nanofiibermattide mõju, viidi kõigepealt läbi eelkatse, et hinnata TDtesti efektiivsust mattide testimisel.

Selleks külvati spaatliga tassidele 100 µl rakke kahel erineval kontsentratsioonil – 10^7 CFU ja 10^6 CFU. Eeltestis kasutati fiibermattide asemel antibiootikumiga immutatud 6mm filterpaberkettaid. Erinevate antibiootikumikontsentratsioonide mõju hindamiseks tehti katse kolmes korduses, kus igale filtrile tilgutati 5µl erineva kontsentratsiooniga klooramfenikoolilahust – 6mg/mL, 4mg/mL ja 2mg/mL. Tasse inkubeeriti 18h ning tekkinud inhibitsioonitsoonid skaneeriti.

Selleks, et hinnata lisatud glükoosi mõju bakterikasvule, võeti vastavalt igast antibiootikumi kontsentratsioonist tass, millele lisati 5µl 20% glükoosilahust ning tass, millele lisati 5µl destilleeritud vett. Tassid inkubeeriti üleöö ning skaneeriti järgmisel päeval.



Joonis 3. TDtest meetodi eelkatse *E. coli* tüve MG1655 CAM 4mg/mL tasside võrdlus 42h pärast antibiootikumi lisamist. 6mm paberfilter; raku kontsentratsioon tassil 10^6 CFU.

A – Pärast 18h inkubatsiooni lisati 5µl 20% Glc lahust. Sinisega piiritletud 18h järgne antibiootikumi inhibitsioonitsoon. Kollasega piiritletud 42h järgne lisatud 20% Glc lahusest tulenev inhibitsioonitsooni kahanemine.

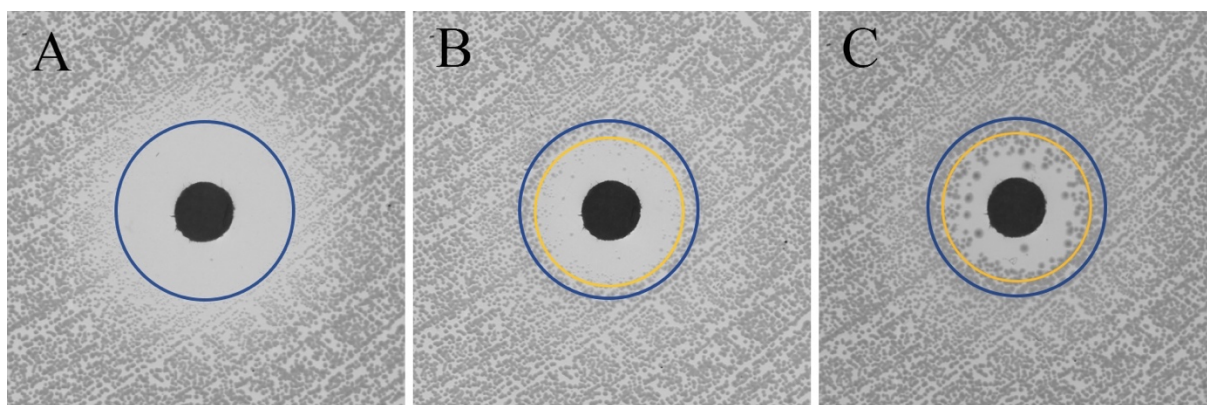
B – Pärast 18h inkubatsiooni lisati 5µl destilleeritud vett. Sinisega piiritletud 18h järgne antibiootikumi inhibitsioonitsoon. 42h järgselt tsooni kahanemist ei esine.

CAM – klooramfenikool; Glc – glükoos; h - tund

Eeltesti läbiviimisel ilmneseid tassidel erinevad inhibitsioonitsoonid. Tassidel, millele lisati 5µl 20% glükoosilahust, oli selgelt eristunud kaks erinevat tsooni piiri – esmane antibiootikumist tekkinud tsoon ning hiljem glükoosilahuse lisamise mõjul kahanenud tsoon. Destilleeritud vee tassidel inhibitsioonitsooni kahanemist ei esinenud. (Joonis 3)

Tulenevalt katse tulemustest otsustati eeltesti täiendada. Külvamisel asendati spaatel vatitikuga, et rakukasv esineks pärast inkubatsiooni ühtlaselt üle kogu tassi. Suurendati ka glükoosilahuse kontsentratsiooni 20%-lt 32%-ni. Samuti lisati testile täiendav etapp – 24h möödudes korrati tassile sama koguse toitaine lisamist. (Joonis 4)

Katses ilmneseid pärast glükoosi lisamist kõige paremini uued kolooniad tassidel, mille rakukontsentratsiooniks oli 10^6 CFU. Seepärast otsustati nanofiibermattide testimisel külvata tassidele sama rakukontsentratsioon.



Joonis 4. Täiendatud eelkatse 6mm filterpaberitega. Rakkude kontsentratsioon tassil 10^6 CFU; A – 18h järgne inhibitsioonitsoon pärast 2 mg/mL CAM (klooramfenikool) lahuse lisamist; B – 42h järgne inhibitsioonitsoon, 24h pärast 5µl 32% glükoosilahuse lisamist; C – 66h järgne inhibitsioonitsoon, 24h pärast lisa 5µl 32% glükoosilahuse lisamist. Sinisega piiritletud antibiootikumi lisamisel tekkinud inhibitsioonitsoon ning kollasega pärast esimese koguse glükoosi lisamist kahanenud tsoon.

2.3.2 Elektrospinnitud klooramfenikooli mattide efektiivsuse uurimine TDtest meetodil

E. coli MG1655 tüve DMSO säilituskultuurist tehti 10x lahjendus filtreeritud LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati loksutil aeroobsetest tingimustes 24h statsionaarse kasvufaasini.

Seejärel plaaditi rakud vatitiku abil 18 LB tardsöötmetassile. Rakkude kontsentratsiooniks tassil oli 10^6 CFU. Tasside keskele asetati 6mm diameetriga nanofiibermatid – kuus kordust nii

CAM/PCL kui CAM/PCL/PEO matist. Ülejäänud kuuele tassidele pandi kontrolliks tavaline 6mm filterpaber, millele tilgutati 5µl 5,6 mg/mL CAM lahust, mille kontsentratsioon sarnanes mattide antibiootikumisisaldusega. Tasse inkubeeriti 18h 37°C kraadi juures.

Pärast inkubatsiooni ilmnemisel tassidel inhibitsioonitsoonid, mis skaneeriti. Tsoonisest kolooniate teket ei esinenud pärast 18h inkubatsiooni, indikeerides, et *E. coli* tüvel MG1655 pole kultuuris tekkinud üksikuid mutante, millel esineks klooramfenikooli suhtes resistentsus.

Seejärel lisati pooltele tassidel olevatest filtritest 5µl 32% glükoosilahust ning pooltele sama palju destilleeritud vett. Kõik tassid inkubeeriti 37°C kraadi juures üleöö.

24h möödudes ilmnemisel tassidest silmnähtav tsoonide kahanemine (Joonis 5 ja Tabelid 1 ja 2). Tsoonide diameetri vähenemine oli suurem glükoositassidel. See viitab, et lisatud glükoos võimaldab ellujäänud rakkudel toitainete defitsiidist taastuda ning moodustada uusi kolooniaid. Tassid skaneeriti ning seejärel korrati eelmist etappi. Pooltele tassidest lisati taas 5µl 32% glükoosilahust ning pooltele 5µl destilleeritud vett. Tassid inkubeeriti üleöö ja skaneeriti järgmisel päeval. Teisel toitainel lisamisel ei ilmnemine aga sama drastilist tsoonide diameetri muutust võrreldes esimese korraga. Destilleeritud vee tassidel silmnähtavat muutust ei esinenud (Joonis 5 ja Tabel 2).

Tabel 1. Antibiootikumi inhibitsioonitsooni diameetrid (mm) pärast antibiootikumi ning kahe järjestikuse glükoosikoguse lisamist.

PCL - polü-ε-kaprolaktoon polümeer; PEO – polüetüleenoksiid polümeer; CAM – klooramfenikool; filter – 6mm filterpaber; +32% Glc – lisatud glükoosilahus; h – tund.

		CAM/PCL	CAM/PCL/PEO	CAM filter
	18h	20 +/- 2,9	24 +/- 1,0	26 +/- 0,4
+32% Glc	42h	16 +/- 2,3	21 +/- 0,9	22 +/- 0,5
+32% Glc	66h	15 +/- 2,9	20 +/- 1,0	21 +/- 0,7

Tabel 2. Antibiootikumi inhibitsioonitsooni diameetrid (mm) pärast antibiootikumi ning kahe järjestikuse koguse vee lisamist.

PCL - polü-ε-kaprolaktoon polümeer; PEO – polietüleenoksiid polümeer; CAM – klooramfenikool; filter – 6mm filterpaber; + dest. vesi – lisatud destilleeritud vesi; h – tund.

		CAM/PCL	CAM/PCL/PEO	CAM filter
	18h	22 +/- 1,4	25 +/- 1,7	26 +/- 0,3
+dest. vesi	42h	20 +/- 1,6	25 +/- 1,4	25 +/- 0,4
+dest. vesi	66h	21 +/- 2,2	26 +/- 0,5	26 +/- 0,2

2.3.3 Inhibitsioonitsoonide varieerumine CAM/PCL, CAM/PCL/PEO ja filterpaberi tassidel

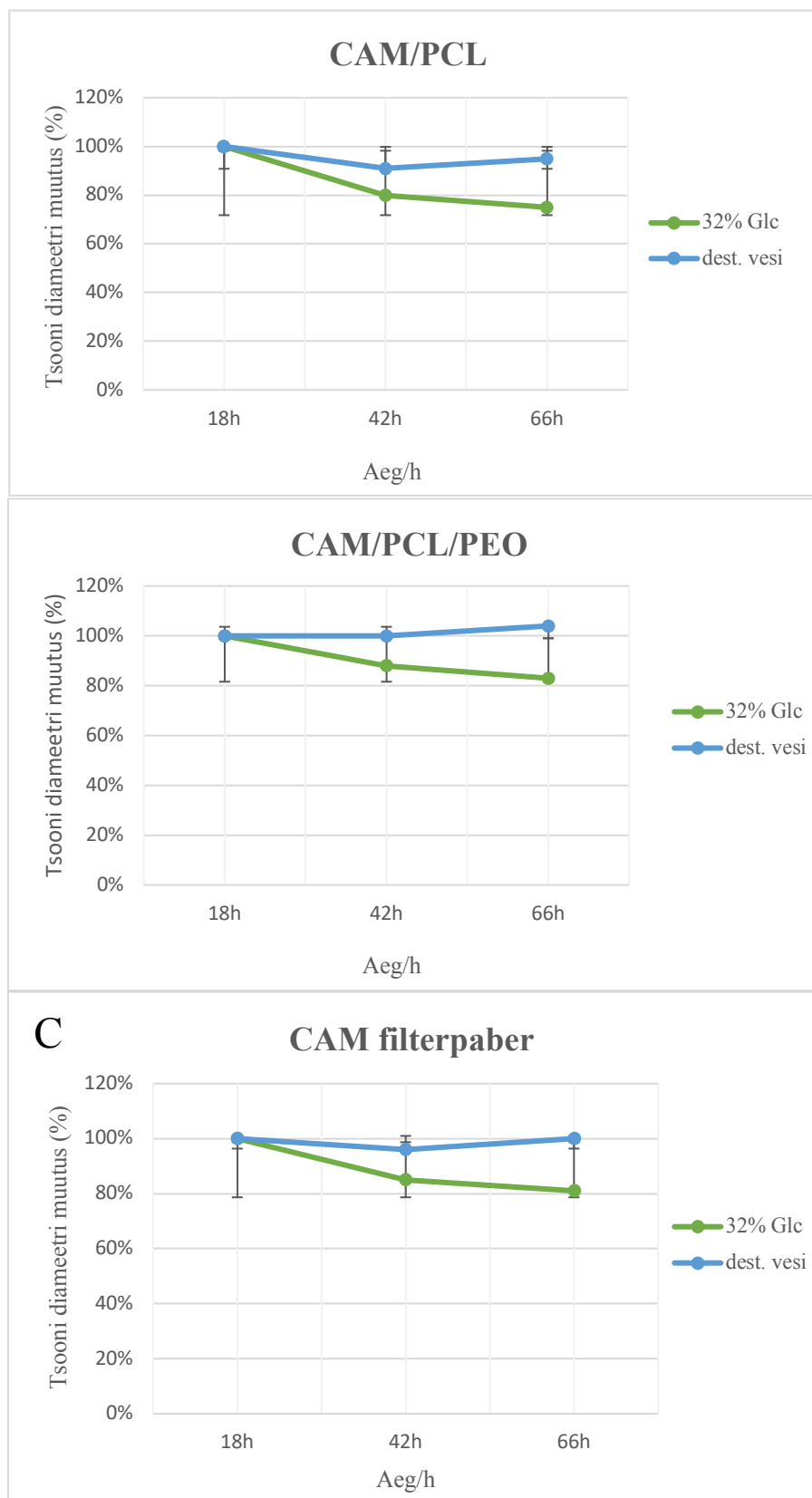
Esmasel antibiootikumi lisamisel esineb kahe CAM/PCL ja CAM/PCL/PEO nanofiibermati tsooni vahel arvestatav erinevus (Tabel 1 ja Tabel 2). Hüdrofiilse CAM/PCL/PEO mati tsoonisuurus sarnaneb tavalise paberfiltri omaga.

Kõige väiksemad inhibitsioonitsoonid esinesid CAM/PCL mattidel, mille suurim diameeter oli 20mm 18h pärast antibiootikumi lisamist. Kahe järjestikuse glükoosi lisamise järel oli diameeter kahanenud 15mm peale.

Tsoonide kahanemine esines kõikidel tassidel, millele oli lisatud glükoosi. Destilleeritud vee tassidel silmnähtavat kahanemist ei esinenud.

Nii glükoosi kui destilleeritud vee lisamisel esinesid CAM/PCL/PEO mati puhul suuremad inhibitsioonitsoonid (Tabel 1 ja Tabel 2). Glükoosi lisamisel ilmnes tassidel inhibitsioonitsoonide diameetri kahanemine esimese 24h jooksul. Destilleeritud vee puhul tsoonide kahanemist ei esinenud. (Joonis 5)

CAM/PCL mati puhul esines inhibitsioonitsoonide diameetrites kõige suurem varieeruvus. (Tabel 1 ja Tabel 2). Inhibitsioonitsoonid olid väiksemad võrreldes CAM/PCL/PEO ja tavalise filterpaberiga. Tsoonide kahanemine oli tugevam glükoosi lisamisel kui destilleeritud vee.



Joonis 5. Inhibitsioonitsoonide diameetrite muutused protsentides CAM/PCL, CAM/PCL/PEO ja CAM filterpaberi tassidel. Paralleelselt toodud muutused lisatud glükoosi ja destilleeritud vee tassidel. A – CAM/PCL 6mm nanofiüermatt; B – CAM/PCL/PEO 6mm nanofiüermatt; C – 5,6 mg/mL klooramfenikooli sisaldav 6 mm filterpaber. Glc – glükoosilahus; dest. vesi – destilleeritud vesi; PCL – polü- ϵ -kaprolaktoon polümeer, PEO – polüetüleenoksiid polümeer; CAM – klooramfenikool; h – tund.

2.4 Arutelu

Antud töös on illustreeritud TDtesti efektiivset kasutusvõimalust nanofiibermattide testimisel. Tassidel esinenud inhibitsioonitsoonide põhjal on võimalik uurida nanofiibermattide mõju bakterikasvu inhibeerimisele ning rakkude suremusele. Samuti aitab teise etapina lisatud täiendav toitaine hinnata bakterite vastupanuvõimet nanofiibermattidele keskkonnas, kus ei esine toitainete defitsiiti.

Katses ilmnesis CAM/PCL tasside puhul väiksemad inhibitsioonitsoonid, mis võiksid viidata, et hüdrofoobsem ning seeläbi aeglasemalt antibiootikumi eraldav matt ei ole võimeline baktereid nii edukalt tapma, kui seda on hüdrofiilne CAM/PCL/PEO matt, mis tagab keskkonnas äkilise kõrge antibiootikumikontsentratsiooni tõusu. Tulemus erineb varem avaldatud katsetest, kus sarnases katses ei nähtud inhibitsioonitsooni erinevusi uuritavate fiibermattide ümber. (Preem *et al.*, 2017)

Preem *et al.* (2017) viis katse läbi diskdifusiooni meetodil, mille puhul täiendavaid toitaineid tassile ei lisata. Sarnaselt meie läbiviidud katsele kasvatati rakke ette üleöö ning plaaditi tassile 3×10^6 CFU. Eelnevalt meie poolt läbiviidud eeltestis aga seost tassile plaaditud rakkude arvu ning inhibitsiooniringi suuruste vahel ei ilmnenu.

Lisaks esines meie läbiviidud katses CAM/PCL mati tasside inhibitsioonitsoonide diameetrite vahel suur erinevus, mis võib olla tingitud hoopis nanofiibermaterjali enda antibiootikumisisalduse varieerumisest. Seetõttu võis katses kasutatud CAM/PCL mattide antibiootikumisisalduses esineda erinevus nii kolme korduse vahel kui ka CAM/PCL ja CAM/PCL/PEO mati vahel. Preem *et al.* (2017) läbi viidud katses CAM/PCL ja CAM/PCL/PEO mattide inhibitsioonitsoonide diameetrites erinevusi ei esinenud. Seetõttu peaks katset korrates kindlasti veenduma, et kõigi kasutatud mattide antibiootikumisisaldus on sama.

Käesoleva töö jaoks läbiviidud katse kestis 66h. CAM/PCL matist vabaneb aga esimese 78h jooksul vaid 60% kogu raviainest. Samal ajal kui CAM/PCL/PEO matist on esimese tunni lõpuks vabanenud pea 95%. (Preem *et al.*, 2017) Seetõttu selleks, et hinnata CAM/PCL nanofiibermati pikemaajalisemat mõju, oleks tarvilik pikendada katseaega.

Meie poolt läbiviidud katse põhjal ei ole võimalik kindlaks teha, kumb nanofiibermatt on edukam bakterite kasvu inhibeerimisel. Selleks, et saada täpsemaid tulemusi, tuleks veenduda, et kõigi mattide antibiootikumisisaldus on võrdväärne ning võimalusel tuleks pikendada katseaega, et näha CAM/PCL mati pikemaajalist toimet bakterikasvule.

Preem *et al.* (2017) on aga oma artiklis viidanud, et antibiootikumi aeglasem eraldumine maatriksist inhibeerib tõhusamalt biofilmi moodustumist võrreldes kiirema vabanemisega. Seetõttu selleks, et vältida bakterite kinnitumist matile, on vajalik, et polümeermaatriksil säiluks ka pidev antibakteriaalne mõju. Kõige efektiivsemaks viisiks bakterite kasvu inhibeerimisel oleks sel juhul kombinatsioon kahest erineva kiirusega antibiootikumi vabastavast maatriksist, mille puhul esineks keskkonnas nii esmane kiire ja tugev antibiootikumi kontsentratsiooni tõus kui ka püsiv stabiilne kontsentratsioon, mis hoiaks ära uute kolooniate tekke nii matil kui haavas. Tulevikus võiksid tagada efektiivse haavaravi mitmekihilised nanofiber haavakatted, mille erinevatel kihtidel esineb erinev antibiootikumi vabastamise võime. (Preem *et al.*, 2017)

TDtest meetodil oleks võimalik testida ka kombineeritud mitmekihilisi nanofiibermatte. Võttes testi paralleelideks näiteks nii kiire, aeglase kui ka kombineeritud antibiootikumi vabastamiskiirusega matid, on võimalik hinnata, milline mattidest on bakterite kasvu inhibeerimisel kõige edukam.

Kokkuvõte

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates kirjeldati tänapäeval kasutusel olevaid antibiootikume, nende erinevaid toimemehhanisme ning sihtmärke bakterirakus. Samuti tutvustati mõningaid antibiootikumitundlikkuse testimismeetodeid ning toodi välja mehhanismid, mis võimaldavad bakteritel antibiootikumide juuresolekul ellu jääda.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida TDtest meetodi (Gefen *et al.*, 2017) sobivust nanofiibermattide testimisel ning erineva kiirusega antibiootikumi eraldavate nanofiibermattide võimet inhibeerida bakterite kasvu *E. coli* tüve MG1655 näitel.

Selleks asetati *E. coli* MG1655 tüve tassidele kaks erinevat klooramfenikooli sisaldavat PCL ja PCL/PEO nanofiibermatti ning jälgiti muutusi inhibitsioonitsoonide tekkimisel. Kontrolliks kasutati filterpaberile tilgutatud klooramfenikoolilahust, mille kontsentratsioon sarnanes mattide omaga. Et hinnata bakterite taastumisvõimet ning vältimaks toitainete defitsiidi tekkimist tassil, lisati kahe etapina pooltele tassidest glükoosilahust ning ülejäänutele kontrolliks destilleeritud vett.

Katse tulemused kinnitasid fakti, et TDtest on sobilik meetod nanofiibermattide testimiseks. Selleks, et täpsemalt hinnata nanofiibermattide efektiivsust, tuleks aga tagada, et kõigi kasutatud nanofiibermattide antibiootikumisisaldus on sama ning mattide pikemaajalise toime testimiseks tuleks pikendada TDtest meetodi katseaega.

Testing the efficiency of chloramphenicol loaded nanofiber mats using the TDtest method

Helen Paapstel

Summary

Chronic wounds are characterized by a significantly increased risk of bacterial infection. Different bacterial populations can form biofilms and induce inflammation in an open wound, thereby slowing down the healing process. (Abrigo *et al.* 2014)

The broad spectrum of antibacterial and therapeutic properties of electrospun nanofibers make them potentially an ideal component in different wound dressings. (Chen *et al.*, 2017) The nanofiber dressings incorporated with antimicrobial agents could contribute to the wound healing process as well as help eliminate an occurring infection. (Abrigo *et al.* 2014)

Reoccurring infections are usually caused by a small subpopulation of bacteria known as the persisters. Persister cells are capable of successfully coping with the lethal effect of the antibiotic in the environment, while the rest of the population is killed. (Gefen *et al.*, 2017) The TDtest method (Gefen *et al.*, 2017) was introduced to detect persistent bacteria in a population by eliminating the nutrient depletion which occurs during the disk diffusion method. (Gefen *et al.*, 2017)

In this thesis, we carried out the TDtest in order to assess the efficiency of chloramphenicol loaded PCL and PCL/PEO nanofiber mats. The two chloramphenicol loaded nanofiber mats were placed on the agar plates of *E. coli* strain MG1655 to examine the formation of the inhibition zones. To overcome the nutrient depletion, 5µl of 32% glucose was added twice to half of the plates. As a control sample, the rest of the plates were treated with the same amount of distilled water.

We concluded that the TDtest (Gefen *et al.*, 2017) is a qualified method for testing the efficiency of antibacterial drug-loaded nanofiber mats. However, it is important to ensure that all of the nanofiber mats used in the test carry the same concentration of the antibiotic in order to obtain accurate results. Further, the duration of the TDtest should be prolonged in future studies to assess the long-term impact of these nanofiber mats.

Kasutatud kirjandus

Abrigo, M., McArthur, S. L. & Kingshott, P. (2014) „Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects“, *Macromolecular Bioscience*, 14(6), lk 772–792. doi: 10.1002/mabi.201300561

Artsimovitch, I., Chu, C., Lynch, A. S. & Landick, R. (2003) „A New Class of Bacteria RNA Polymerase Inhibitor Affects Nucleotide Addition“, *Science*, 302(5645), lk 650–654. doi: 10.1126/science.1087526

Bauer, A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. (1966) „Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.“, *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), lk 493–496

Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. (2010) „Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique“, *Biotechnology Advances*, 28(3), lk 325–347. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. (2016) „Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment“, *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), lk 320–330. doi: 10.1038/nrmicro.2016.34

Bugg, T. D. H. & Walsh, C. T. (1992) „Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance“, *Natural Product Reports*, 9(3), lk 199. doi: 10.1039/np9920900199

Chen, C. R., Malik, M., Snyder, M. , Drlica*, K. (1996) „DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage“, *Journal of Molecular Biology*, 258(4), lk 627–637. doi: 10.1006/jmbi.1996.0274

Chen, D. W.-C. & Liu, S.-J. (2015) „Nanofibers used for delivery of antimicrobial agents“, *Nanomedicine*, 10(12), lk 1959–1971. doi: 10.2217/nnm.15.28

Chen, S., Liu B., Carlson, M. A., Gombart, A. F., Reilly, D. A., Xie J. (2017) „Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing“, *Nanomedicine*, 12(11), lk 1335–1352. doi: 10.2217/nnm-2017-0017

Courcelle, J. & Hanawalt, P. C. (2003) „RecA-Dependent Recovery of Arrested DNA Replication Forks“, *Annual Review of Genetics*, 37(1), lk 611–646. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.142616

Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. (2007) „Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression“, *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.00015-06

Dhawan, S., Dhawan, K., Varma, M., Sinha, V. R. (2005) „Applications of Poly (ethylene oxide) in drug delivery systems“, *Pharmaceutical Technology*, 1(September), lk 82–96

Fleming, A. (1929) „On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae.“, *British Journal of Experimental Pathology*, 10, lk 226–236

Fymat, A. L. (2011) „Antibiotics and Antibiotic Resistance“, *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. doi: 10.26717/BJSTR.2017.01.000117

Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., Balaban, N. Q. (2017) „TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay“, *Scientific Reports*, 7(December 2016), lk 1–9. doi: 10.1038/srep41284

Geigenmüller, U. & Nierhaus, K. H. (1986) „Tetracycline can inhibit tRNA binding to the ribosomal P site as well as to the A site“, *European Journal of Biochemistry*, 161(3), lk 723–726. doi: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb10499.x

Greiner, A. & Wendorff, J. H. (2007) „Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers“, *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(30), lk 5670–5703. doi: 10.1002/anie.200604646.

Howell, S., Hazen, K. & Brandt, M. (2015) *Manual of Clinical Microbiology*, In Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Carroll K. C., Funke G., Landry M. L., Richter S. S., Warnock D. W. (ed.) doi: 10.1128/9781555817381

Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z., Jing, X. (2014) „Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications“, *Journal of Controlled Release*. 185(1), lk 12–21. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.018

Kahlmeter, G., Brown, D. F. J., Goldstein, F. W., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Österlund, A., Rodlodd, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P., Vatopoulos, A. (2003) „European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria“, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), lk 145–148. doi: 10.1093/jac/dkg312

Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., Walsh, C. (2005) „Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics“, *Chemical Reviews*, 105(2), lk 425–448. doi: 10.1021/cr030103a

Kaldalu, N., Hauryliuk, V. & Tenson, T. (2016) „Persisters—as elusive as ever“, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(15), lk 6545–6553. doi: 10.1007/s00253-016-7648-8

Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., Lewis, K. (2004) „Persister cells and tolerance to antimicrobials“, *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), lk 13–18. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00856-5

Khodursky, A. B. & Cozzarelli, N. R. (1998) „The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials“, *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), lk 27668–27677. doi: 10.1074/jbc.273.42.27668

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010) „How antibiotics kill bacteria: from targets to networks“, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(6), lk 423–435. doi: 10.1038/nrmicro2333

Lewis, K. (2013) „Platforms for antibiotic discovery“, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 12(5), lk 371–387. doi: 10.1038/nrd3975

Martínez, J. L., Coque, T. M. & Baquero, F. (2015) „What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes“, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 13(2), lk 116–123. doi: 10.1038/nrmicro3399

Matuschek, E., Brown, D. F. J. & Kahlmeter, G. (2014) „Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories“, *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4). doi: 10.1111/1469-0691.12373

Menninger, J. R. & Otto, D. P. (1982) „Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(5), lk 811–818. doi: 10.1128/AAC.21.5.811

Mizuno, S., Yamazaki, H., Nitta, K., Umezawa, H. (1968) „Inhibition of initiation of DNA-dependent RNA synthesis by an antibiotic B44P“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 30(4), lk 379–385. doi: 10.1016/0006-291X(68)90755-9

Preem, L., Mahmoudzadeh, M., Putrinš, M., ... Kogermann, K. (2017) „Interactions between Chloramphenicol, Carrier Polymers, and Bacteria-Implications for Designing Electrospun Drug Delivery Systems Countering Wound Infection“, *Molecular Pharmaceutics*, 14(12), lk 4417–4430. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00524

Stalons, D. R. & Thornsberry, C. (1975) „Broth-Dilution Method for Determining the Antibiotic Susceptibility of Anaerobic Bacteria“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(1), lk 15–21. doi: 10.1128/AAC.7.1.15

Tenover, F. C. (2006) „Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria“, *American Journal of Infection Control*, 34(5 Supplement). lk S3-S10 doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.219

Tuomanen, E., Durack, D. T. & Tomasz, A. (1985) „Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(4), lk 521–527. doi: 10.1128/AAC.30.4.521

Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. (2008) „Peptidoglycan structure and architecture“, *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), lk 149–167. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x

Walsh, C. (2003) *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. American Society of Microbiology Press. doi:10.1128/9781555817886

Walsh, C. (2003) „Where will new antibiotics come from?“, *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), lk 65–70. doi: 10.1038/nrmicro727

Wang, J. & Windbergs, M. (2017) „Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds“, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 119, lk 283–299. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.07.001

Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. (2008) „Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances“, *Nature Protocols*, 3(2), lk 163–175. doi: 10.1038/nprot.2007.521

Wilson, D. N. (2014) „Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance“, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 12(1), lk 35–48. doi: 10.1038/nrmicro3155

Woodruff, M. A. & Hutmacher, D. W. (2010) „The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century“, *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(10), lk 1217–1256. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Zhao, X., Xu, C., Domagala J., Drlica, K. (1997) „DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), lk 13991–13996. doi: 10.1073/pnas.94.25.13991

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helen Paapstel,
(sünnikuupäev: 29.07.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Klooramfenikooli sisaldavate nanofiibermattide efektiivsuse uurimine TDtest meetodil”, mille juhendajad on Marta Putrinš ja Liis Preem,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018

Tänu sõnad

Siiras ja sõnulseletamatu tänu minu juhendajatele Marta Putrinšile ja Liis Preemile, kes on olnud minu juhendamisel ja õpetamisel ääretult kannatlikud ning on mulle töö kirjutamisel nõu ja jõuga igati toeks olnud.

Samuti tänan Tanel Tensoni töögruppi kuuluvaid inimesi, kes mulle laboris suuremal või väiksemal määral lahke abikäe ulatasid.

Suur tänu!